

「人工多能性幹細胞(iPS 細胞)作製・制御等の医療基盤技術」
平成 20 年度採択研究代表者

篠原 隆司

京都大学大学院医学研究科 教授

精子幹細胞のリプログラミング機構の解明と医学応用の可能性の検討

1. 研究実施の概要

我々は Germline Stem (GS) 細胞と multipotent Germline Stem (mGS) 細胞の融合条件を検討し、融合細胞を得ることに成功した。また、これまで Embryonic Germ (EG) 細胞として樹立することが不可能であった時期の胎生期のオス生殖細胞(胎生期 13.5-18.5 日)から 1/20 回の低頻度ではあるが、Embryonic Stem (ES) 細胞と同様な機能をもつ多能性幹細胞の樹立に成功した。培養に用いた条件は EG 細胞の誘導条件と異なり、mGS 細胞の樹立条件と同じであった。このことから、胎生中期以降を境に生殖細胞は生後の生殖細胞と同じタイプの多能性細胞に変化することが示唆された。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

I. GS 細胞から mGS 細胞を生じるメカニズムの解析

(1)細胞融合による GS 細胞と mGS 細胞の性質の解析

全身に LacZ 遺伝子を発現する ROSA26 マウスから GS 細胞を樹立し、同じく全身に GFP 遺伝子を発現するグリーンマウスから GS、mGS 細胞を樹立した。前者にはもともと neomycin 耐性遺伝子が transgene として入っており、後者には puromycin 耐性遺伝子を導入し、安定発現株を得た。これらの細胞を用いて細胞の融合条件を検索したところ、mGS 細胞については GS 細胞、体細胞などの融合細胞を得ることができた。一方、GS 細胞については mGS 細胞との融合細胞を得ることができたものの、体細胞との融合細胞を得ることはこれまでのところできてない。胎児脳由来の neurosphere、胸腺細胞、骨髄細胞、mouse embryonic fibroblast などを体細胞の融合相手として選んだが、いずれも electrofusion やポリエチレングリコールによる融合直後に融合細胞は見られたものの、neomycin と puromycin の 2 重の薬剤選択後にコロニーを得ることができなかった。

(2) DNA メチル化酵素(DNMT 酵素)の影響の解析

この研究は GS 細胞における DNA メチル化の異常が mGS 細胞への誘導を促すものかを検

討するものである。GS 細胞には DNMT1, DNMT3 が発現されているが、DNMT3L は発現されていない。DNMT-1, 3 の conditional knockout マウスは既に研究代表者の研究室に導入済みである。ICR マウスにバッククロスしたノックアウトマウスより DNMT1, DNMT3 についての conditional KO された GS 細胞の樹立を行った。

以上の遺伝子欠損による機能解析に加え、DNMT1, DNMT3L, DNMT3a2 の過剰発現 GS 細胞を得るために、発現ベクターの構築を行った。DNMT3L については GS 細胞への遺伝子導入を完了し、精巣への移植を行った。その結果、DNMT3L の遺伝子導入によりとくに mGS 細胞への変化を観察することはできず、精子形成が減数分裂中期で停止することが確認された。残りの2つの遺伝子については遺伝子導入を行ったばかりである。

(3) mGS 細胞の起源の同定

これまで mGS 細胞は GS 細胞が起源なのか、それとも別種類の生殖細胞から生じるのか明らかになっていなかった。我々は neomycin 耐性遺伝子の遺伝子導入を行なった GS 細胞から mGS 細胞が出現することより、GS 細胞が直接 mGS 細胞へと変化することを明らかにした。ただその頻度は 1/103 程度と低いものであった。

II. mGS 細胞樹立の効率化

(1) 精子幹細胞の新規増殖因子の同定

GS 細胞の DNA マイクロアレイの結果に基づき、新規の増殖促進因子についての25種類の分子、化合物を試したが、これまでのところ効果のあるものを認めることができなかった。しかしながら、GS 細胞が高レベルで発現している beta1-integrin はこの細胞がニッシュへとホーミングするのに必要であることを見いだすことができた²⁾。現在、この分子が GS 細胞の増殖にどの程度関与しているか検討中である。また DNA アレイに加え、microRNA についてのアレイを予備的に行った。

(2) 胎生期の生殖細胞由来の mGS 細胞の樹立

mGS 細胞は生後の精巣細胞から樹立されるが、我々は胎児期の生殖細胞であればより効率よく mGS 細胞を樹立できるのではないかと考え、胎生 12.5-18.5 日の生殖細胞を用いて mGS 細胞の樹立を試みた。胎生期の生殖細胞をトリプシンで回収し、GS 細胞の培養条件 (EGF + bFGF + GDNF + LIF) で細胞培養を行った。その結果、GS 細胞と似た細胞を樹立するとともに (我々はこの細胞を embryonic germline stem cell, eGS 細胞と名付けた)、胎生 12.5 と 14.5 日の精巣より mGS 細胞を得ることができた (図 1)¹⁾。従来胎生 13.5 日以降の生殖細胞は EG 細胞に変化することがないとされていたが、これらの結果は gonocyte のステージの生殖細胞にも mGS 細胞に変化する能力があることを示す。また、EG 細胞の培養条件 (SCF + LIF + bFGF) とは異なる培養条件であったことから、EG 細胞の樹立とは違ったメカニズムで mGS 細胞が得られたことが示唆された。しかしながら、その頻度は 1/20 回の低頻度であり、とくにこのステージの細胞がより高頻度に mGS 細胞として樹立できるわけではなかった。

この胎児期の生殖細胞から樹立された eGS 細胞は mGS 細胞のもつ多能性を示さないものの、不妊マウスの精巣内に移植後、精子形成を行うことができる。この細胞を由来とした個体には H19, Snrpn 遺伝子の differentially methylated region においてメチル化の異常を観察した。

また、その異常なメチル化は子孫にも伝達されることがわかった。従来の生殖系列幹細胞由来の子孫ではエピジェネティックな異常は次世代では消失することが知られていたが、この eGS 細胞では、その形質が持続すること点で異なる。



図 1. 左より GS 細胞、eGS 細胞 (胎生 12.5 日由来)、ES 様細胞 (胎生 14.5 日由来)

(3) 遺伝子導入による mGS 細胞の樹立

GS 細胞に Oct4, Sox2, Myc, Klf4 遺伝子の4因子の強制発現を試みるために、4種類の遺伝子のレトロウイルスへの DNA 組み替えを行った。また、山中研より Nanog-IRES-puro の BAC トランスジェニックマウスを導入した。

当初の予想通り、GS 細胞に直接レトロウイルスにより遺伝子導入を行った場合は遺伝子のサイレンシングがおり、遺伝子発現の消失が確認された。そこで、これらの遺伝子をレンチウイルスに変更し、遺伝子導入を行ったところ、ベクターおよび IRES による共発現遺伝子の性質により遺伝子発現レベルの差が見られた。例えば、同じ elongation factor-1 (EF-1)プロモーターを利用したレンチウイルスにも関わらず、IRES-puro の遺伝子を強発現した場合は GS 細胞の形態に大きな変化を見ることができなかつたが、IRES-venus の遺伝子によつた場合には GS 細胞の増殖が急に刺激されるといった例が見られた。このレンチウイルスは生殖細胞でも発現し、子孫にも伝達されることは確認されている³⁾。これまでのところ、CAG 系のプロモーターでは発現レベルが低いため、外見上の GS 細胞の変化は見られなかつた。これらの山中 factor に加え、dominant negative p53 遺伝子、UTF 遺伝子、Ras 遺伝子 Nanog 遺伝子についても同じコンストラクトを利用してレンチウイルス発現ベクターを構築した。

これまでの結果では精巢細胞に山中 factor を導入した場合、ES 細胞と非常によく似た形態をしたコロニーが多数観察することができた。しかしながら、体細胞と同様にこれらの細胞の中で Nanog 遺伝子が発現しているものは限られており、現在これらの細胞を expansion し、characterize している段階である。

III. ES 細胞との生物学的な差の評価

(1)長期培養における安定性の評価

我々は ES 細胞、EG 細胞、mGS 細胞(2系統)を用いて約3ヶ月間(50 passages)の連続培養を行った。培養継続期間においては外見上とくに形態上の変化は見られず、また増殖スピードについてもほぼ培養当初の継代頻度(2-3日で4-5倍の継代)を保持したままであつた。また中辻研究室より、染色体解析の方法を習得した。

(2)DNAダメージ後のストレス反応の解析

GS細胞を用いて放射線照射の生存条件の解析を予備的に行なったが、とくにGS細胞で生存が促進されている結果を得る事ができなかった。現在、生体内の精子幹細胞における放射線耐性能を調べるために、EGFPを発現するGreen mouseとp53 knockoutマウスの交配を進めるべく、p53 knockoutマウスのコロニーを確立しつつある。

(3)細胞の初期化能の解析

GS細胞とmGS細胞の融合条件について決定することができた。Electrofusion法、polyethylene glycol法のいずれによっても安定的にmGS細胞とGS細胞の融合を達成することができた。またOct4プロモーターを持つEGFPマウスについてはマウスコロニーへ導入が終了した。

3. 研究実施体制

「篠原」グループ

- ①研究分担グループ長:篠原 隆司(京都大学、教授)
- ②研究項目
 - I. GS細胞からmGS細胞を生じるメカニズムの解析
 - II. mGS細胞樹立の効率化
 - III. ES細胞との生物学的な差の評価

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Miki, H., Inoue, K., Morimoto, T., Morimoto, H., Ogura, A. and Shinohara, T. 2009. Heritable imprinting defect caused by epigenetic abnormalities in mouse spermatogonial stem cells. Biol. Reprod.80, 518-527.
2. Kanatsu-Shinohara, M., Takehashi, M., Takashima, S., Lee, J., Chuma, S., Nakatsuji, N., Fässler R. and Shinohara, T. 2008. Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on β 1-integrin. Cell Stem Cell 3, 533-542.
3. Kanatsu-Shinohara, M., Kato, M., Takehashi, M., Morimoto, H., Takashima, S., Chuma, S., Nakatsuji, N., Hirabayashi, M. and Shinohara, T. 2008. Production of transgenic rats via lentiviral and xenogeneic transplantation of spermatogonial stem cells. Biol. Reprod.79, 1122-1128.